

みにれびゅう

膜タンパク質を一網打尽：小胞体分子 Meigo による 樹状突起ターゲティング制御機構

千原 崇裕

1. はじめに

神経細胞は高度に極性化し、軸索と樹状突起という機能的、構造的に異なる細胞突起を有する。そしてこれらの突起を適切な接続相手へと伸長、接続することで機能的な神経回路網を形成する。これまで軸索を中心とした研究により、数多くの軸索ガイダンス受容体・リガンドが同定され、基本的な軸索ガイダンスの分子機構が明らかにされてきた。一方、樹状突起に関する研究は、その複雑な形態のため大きく遅れていた。しかし近年、樹状突起も軸索と同様にシナプス結合相手を探し出し、積極的に神経回路形成に関わっていることが網膜神経節細胞や運動神経などで示され、樹状突起形成を制御する分子基盤に注目が集まっている^{1,2)}。

樹状突起の形態形成、特に神経回路の特異性を規定するような形態を研究する場合には、「生体内」で生理的な状態の樹状突起形態を、「1細胞レベルの解像度」で詳細に解析する必要がある。筆者らは、このような条件を備えた実験系としてショウジョウバエ嗅覚系二次神経・投射神経の樹状突起³⁾を採用し、樹状突起の形態形成、特に樹状突起ターゲティングに関する研究を進めている。本稿では、まず投射神経を用いた研究から得られた樹状突起ターゲティングに関する知見を説明し、さらに筆者らが見いだした小胞体分子 Meigo による樹状突起ターゲティング制御機構に関して紹介する。

2. ショウジョウバエ嗅覚系二次神経・投射神経

ここで紹介する投射神経とは、ショウジョウバエ嗅覚系

二次神経のことである(図1A)。まず、ショウジョウバエの匂い情報は、触角第三節とマキシラリーパルプに存在する嗅覚受容体神経によって受容され、その軸索によって触角葉に伝えられる。触角葉は、約50個のシナプス構造体「糸球体」から構成される嗅覚一次中枢で、それぞれの糸球体は異なる嗅覚受容体神経からの情報を受け取っている(図1A右)。投射神経の樹状突起は、この50個の糸球体の中から一つを選び出して投射している。このような組織(触角葉)内でのシナプスパートナー選択は「樹状突起ターゲティング」と呼ばれ、これにより各糸球体上で1対1(1種類の嗅覚受容体神経の軸索と1種類の投射神経の樹状突起)の特異的なシナプス結合が実現されている。また、ショウジョウバエの高度な遺伝学的手法である MARCM (mosaic analysis with a repressible cell marker) 法⁴⁾を用いることにより、投射神経の遺伝子型を脳内で1細胞レベルの解像度で操作することが可能になる。これによりショウジョウバエ脳神経細胞(約4万個)の中から一つの投射神経のみをポジティブにラベルしたり、同時に任意の遺伝子の発現を制御できるようになる。このように、明確な樹状突起ターゲティングを示し MARCM 法を活用できるショウジョウバエ嗅覚系二次神経の樹状突起は、樹状突起ターゲティングの分子機構を解析する上で有用なモデル系となる。

3. 「体軸」および「糸球体個性」情報を用いた樹状突起ターゲティング

では、この樹状突起ターゲティングは、どのような分子機構によって制御されているのだろうか？ いい換えると、それぞれの投射神経は、どのようにして50個の糸球体の中から一つを選び出しているのだろうか？ これまでの研究により、大きく2段階の樹状突起ターゲティング様式が提唱されている。一つ目は、「体軸情報」を利用したターゲティング様式である。たとえば、軸索ガイダンスを制御する1回膜貫通型タンパク質 Semaphorin-1a は、投射神経が樹状突起を伸長する時期に発現する⁵⁾(図1B左)。興味深いことに、触角葉の「背側-側方側」にターゲティングする樹状突起は Semaphorin-1a を強く発現し、逆に、

東京大学大学院薬学系研究科 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

Meigo, an endoplasmic reticulum protein controls the amount and quality of membrane proteins regulating dendrite targeting

Takahiro Chihara (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 7-3-1, Japan)

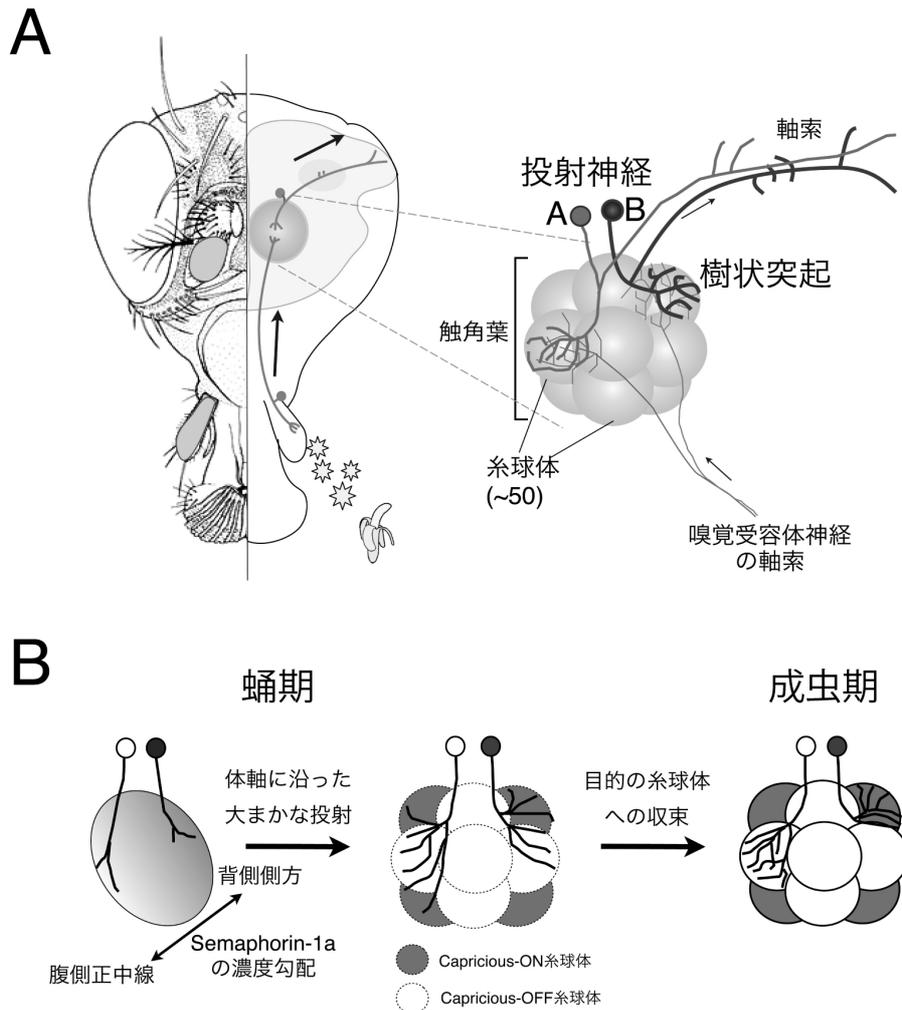


図1 ショウジョウバエ嗅覚神経回路の模式図と投射神経の発生様式

(A) 匂い情報は嗅覚受容体神経によって受容され、嗅覚一次中枢・触角葉に伝えられる(左)。触角葉は約50個の糸球体によって構成される(右)。投射神経の樹状突起は50個の糸球体の中から適切な一つを選び出し投射する。ここでは、Aタイプ、Bタイプの投射神経がそれぞれ異なる糸球体へ樹状突起を投射しているようすを图示している。(B) 投射神経の樹状突起が目的の糸球体へ投射する過程を示した模式図。Semaphorin-1aは発生過程の触角葉全体で、背側側方-腹側正中線方向に沿った発現濃度勾配を形成する。Capriciousは糸球体ごとに異なる発現量を示す。樹状突起は蛹期0時間から投射を開始し、蛹期18時間にはSemaphorin-1aの濃度勾配に沿って触角葉内の目的領域へ投射する。その後、CapriciousやDN-Cadherinなどの機能を利用してそれぞれの糸球体へ収束する。

「腹側-正中線側」にターゲットする樹状突起はSemaphorin-1aを弱く発現する。すなわち、Semaphorin-1aは発生過程の触角葉内において「背側-側方側」から「腹側-正中線側」に向けた発現の濃度勾配を形成している。さらに、このSemaphorin-1aの濃度勾配は樹状突起ターゲット自体にも関与している。たとえば、本来「背側-側方側」へ投射する樹状突起でSemaphorin-1aをノックダウンすると、その樹状突起は「腹側-正中線側」へ誤って投射する。逆に、本来「腹側-正中線側」へ投射する樹状突起でSemaphorin-1aを過剰発現すると、その樹状突起は「背側-側方側」へと誤って投射するようになる。これらの

結果から、樹状突起は、触角葉内の体軸に沿った位置情報を形成し、それを自ら利用することにより、触角葉内における大まかな投射先を決定していると考えられる。

二つ目の樹状突起ターゲット様式として、「糸球体ごとの個性(発現分子の違い)」を利用したものがある。Capriciousは視神経、運動神経の軸索投射で研究の進んだロイシンリッチリピートを持つ1回膜貫通型タンパク質である。その発現様式はSemaphorin-1aの場合とは異なり、強く発現する樹状突起(Capricious-ON糸球体)と発現しない樹状突起(Capricious-OFF糸球体)が触角葉内にゴマ塩パターンで存在する⁶⁾(図1B)。Capriciousの発現は、樹

状突起が糸球体内へ投射し、そこで収束するのに必要である。たとえば、Capricious-ON 樹状突起で Capricious をノックダウンすると樹状突起は Capricious-OFF 糸球体へも投射するようになる。

以上のように Semaphorin-1a, Capricious の研究から、投射神経の樹状突起は触角葉内の「体軸位置情報」、および「糸球体の個性」を利用することにより、目的の糸球体へ投射することが明らかになっている。しかし、当初の「それぞれの投射神経は、どのようにして 50 個の糸球体の中から一つだけを選び出しているのか」という問いに対する答えを見いだすにはこれらの分子だけでは不十分である。さらに多くの分子の同定や、ターゲティング様式の提案が必要であり、今後の研究が待たれる。

4. 樹状突起ターゲティング変異体 *meigo*

1) 触角葉内の新たな体軸位置情報の存在を示唆する変異体 *meigo*

筆者らは投射神経の樹状突起ターゲティングを制御する新たな因子の同定を目指し、MARCM法を利用した遺伝学的モザイクスクリーニングを行った⁷⁾。その結果、強い樹状突起ターゲティング異常を示す変異体を単離し、その表現型に因んで *meigo* (*medial glomeruli*, 迷子) 変異体と名づけた⁸⁾。投射神経を *meigo* 変異ホモ接合体 (*meigo* 投射神経) にすると、すべての樹状突起は糸球体の境界を認識できず、正中線側へ投射する (図 2A)。この表現型から、触角葉内には Semaphorin-1a の発現濃度によって制御される斜めの体軸方向に加えて、横軸 (正中線-側方) 方向の位置情報が存在し、*meigo* 変異体ではその横軸位置情報の認識に異常があると想定された。

2) *Meigo* は小胞体に局在する糖核酸輸送体様タンパク質である

meigo 変異が示す樹状突起ターゲティング異常の原因は、*CG5802* という未解析の遺伝子におけるミスセンス変異であった。よって我々は、*CG5802* 遺伝子を *meigo* 遺伝子と名づけ、さらに解析を進めた。*meigo* 遺伝子は、小胞体滞留シグナル (KKXX) を持つ 8 回膜貫通型のタンパク質をコードしており、そのアミノ酸配列から糖核酸輸送体活性を持つことが想定される。事実、*meigo* オルソログである *hut1*, *UGTrel1* は糖核酸輸送活性を示す^{9,10)}。しかし、データベース上のほかのショウジョウバエ糖核酸輸送体遺伝子の変異体は、まったく樹状突起ターゲティング異常を示さず、また、それらの遺伝子を過剰発現しても *meigo* 投射神経のターゲティング異常は抑制されなかった。これらの結果は、投射神経の樹状突起ターゲティングには、他の糖核酸輸送体にはない *Meigo* 特有の機能が必要であるこ

とを示唆している。

Meigo は小胞体ストレスと密接な関わりを持つ。*meigo* のオルソログである酵母 *hut1* の変異株は小胞体ストレス感受性であり¹¹⁾、線虫の HUT1 変異体でも恒常的な小胞体ストレスを示すことが報告されている¹²⁾。そこで *meigo* の発現抑制がショウジョウバエにおいても小胞体ストレス応答を誘導するかを検証するために、ショウジョウバエ S2 細胞において *meigo* をノックダウンした。その結果、小胞体ストレス応答の指標である *xbp1* mRNA の特異的スプライシング、および小胞体ストレス応答標的遺伝子群の発現上昇が確認された。同様の小胞体ストレス応答は脳内の *meigo* 投射神経でも確認され、小胞体シャペロンである Hsc3 (ショウジョウバエ BiP) が *meigo* 投射神経の樹状突起に集積しているようすが観察された。さらに、*meigo* 投射神経に小胞体シャペロンのドミナントネガティブ体や、変異タンパク質を過剰発現させることにより小胞体ストレスの負荷を上げたところ、樹状突起ターゲティング異常が悪化した。以上のことから、小胞体分子 *Meigo* は小胞体の恒常性維持に必要であることが明らかになり、「小胞体、もしくは小胞体ストレス応答による樹状突起ターゲティング制御機構」の存在が示唆された。

3) *Meigo* による Ephrin タンパク質の制御

小胞体は、分泌性タンパク質、および膜タンパク質の合成・品質管理を行う細胞内小器官である。そして、小胞体ストレス応答はタンパク質の翻訳抑制や関連遺伝子の転写抑制を引き起こすことが知られている。我々は小胞体分子 *Meigo* が樹状突起ターゲティングを担う分泌・膜タンパク質の合成、品質管理に重要であると仮定し、樹状突起ターゲティングにおいて *Meigo* 制御下にある膜タンパク質を遺伝学的に探索した。その結果、網膜-視蓋神経回路の軸索ガイダンスを制御することで知られる Ephrin¹³⁾ が *meigo* 変異と遺伝学的に強く相互作用することを見いだした。一方、投射神経の樹状突起ターゲティングに必要なことがすでに知られている Semaphorin-1a や DN-Cadherin とは遺伝学的な相互作用を示さなかった。さらに樹状突起ターゲティングにおける Ephrin 自体の機能を調べる目的で Ephrin 単独のノックダウン実験を行ったところ、樹状突起が糸球体に収束できなくなった。一方、横軸方向の樹状突起ターゲティングは正常であった。これらの結果は、Ephrin は *meigo* 変異によって誘導される樹状突起ターゲティング表現型の一部を担っていることを示唆している。すなわち *Meigo* は Ephrin を含む複数の膜タンパク質の品質管理に関与することで、樹状突起ターゲティングを制御していると考えられる。

さらに我々は、*Meigo* がどのように Ephrin の機能を制御しているかを理解する目的で生化学的な解析を進めた。

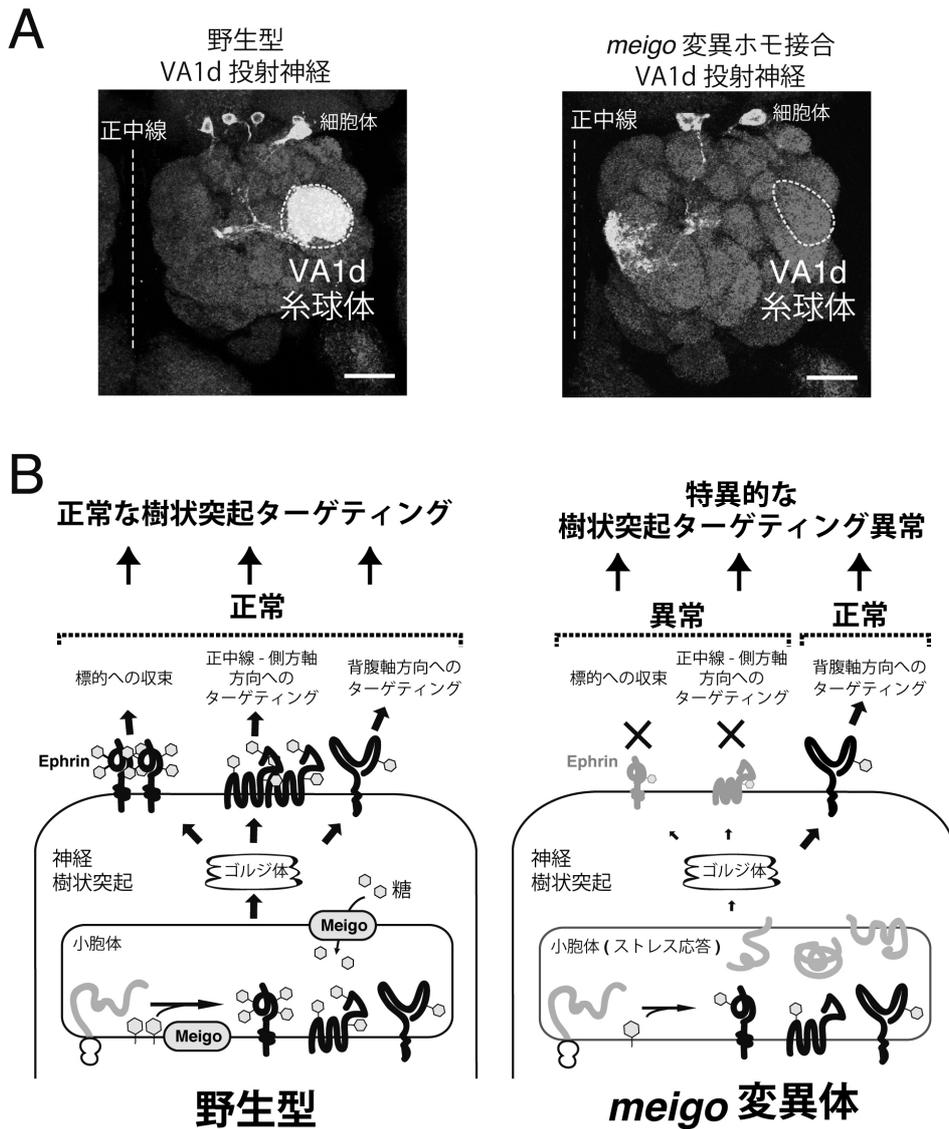


図2 *meigo* 変異体の表現型と Meigo による樹状突起ターゲティング制御モデル
 (A) 野生型 (左) と *meigo* 変異体投射神経 (右) の樹状突起ターゲティング例。野生型の VA1d 投射神経は樹状突起を VA1d 糸球体 (点線丸) へ投射する。一方、*meigo* 変異ホモ接合体になった VA1d 投射神経は、糸球体の境界を認識できず、樹状突起を正中線側 (点直線) へ投射する。(B) Meigo による樹状突起制御モデル。野生型 (左) : Meigo は小胞体に存在し、糖核酸の小胞体への輸送、タンパク質の折りたたみなどをサポートすることにより、膜タンパク質の安定供給を実現する。これにより正常な樹状突起ターゲティングが達成される。*meigo* 変異体 (右) : Meigo 欠損により小胞体ストレス応答が起き、「Ephrin」と「正中線-側方軸方向のターゲティングを担うタンパク質」の量が減少し、機能が減弱する。このとき、「背腹軸方向のターゲティングを担うタンパク質」は影響を受けないと考えられ、その結果、特異的な樹状突起ターゲティング異常が引き起こされる。

その結果、① Ephrin は 4 か所で *N* 型糖鎖修飾を受けること、② Ephrin の *N* 型糖鎖修飾は、効率的な樹状突起ターゲティングに必要であること、さらに③ *meigo* をノックダウンすると Ephrin 上の *N* 型糖鎖量、および Ephrin タンパク質量が減少し、また、Ephrin タンパク質を細胞膜上へ輸送できなくなることを見いだした。これらの結果より、Meigo は Ephrin のタンパク質合成・細胞膜への輸送・*N*

型糖鎖修飾のすべてに関わり、それらが相乗的に働くことによって Ephrin 機能を支えていることが明らかになった。

5. 新しい樹状突起ターゲティング様式を提案する小胞体分子 Meigo

樹状突起ターゲティングには、Semaphorin-1a, Capri-

cious や Ephrin に加え、Dscam, DN-Cadherin などさまざまな膜タンパク質が関与する。一方、小胞体分子 Meigo は、これまでの膜タンパク質とはまったく異なった樹状突起ターゲティング制御様式を提案する。まず、Meigo は大部分の膜タンパク質が通過する小胞体に存在することから、複数の膜タンパク質の量・機能を包括的に制御する。たとえば、Ephrin はその単独変異体の表現型から、Meigo によって制御される膜タンパク質群の中の一つの膜タンパク質にすぎないと考えられる。今後は Ephrin に加えてどのような膜タンパク質が Meigo による制御を受けるのか、特に横軸方向の樹状突起ターゲティングを支配する膜タンパク質の同定が待たれる。

小胞体分子 Meigo は、どのようにして樹状突起ターゲティングの「特異性」を制御しているのであろうか？ Meigo が小胞体を通過する複数の膜タンパク質の量・機能に関与するのであれば、軸索、樹状突起、双方の伸長やターゲティングに異常が出ると予想される。しかし meigo 投射神経では、「横軸方向」の樹状突起ターゲティングにのみ異常を生じ、樹状突起の伸長や縦軸方向への投射、軸索の投射パターンなどは正常であった。このような meigo 変異体が示す表現型の特徴から、我々は以下のような仮説を考えている。たとえば、小胞体は機能的にいくつかの区画されており、それぞれ異なる膜タンパク質の品質管理に関わっている。もしくは、小胞体自体の区画ではなく、小胞体ストレスという生体反応に特異性があることも考えられる。さらに、制御を受ける膜タンパク質自体に特異性を規定する特徴があるのかもしれない。たとえば、膜タンパク質によって、小胞体ストレスに対する感受性が異なることも考えられる。meigo 変異体の解析から想定されるこれらの仮説を生体内で検証することにより、小胞体による樹状突起ターゲティング制御機構の全容が明らかになるであろう。また近年、PERK や Ire1 などの小胞体ストレス関連分子群が、細胞運命決定などに積極的に関わることが報告され^{14,15)}、細胞・組織・個体を制御する分子機構としての小胞体ストレス応答に注目が集まっている。今後 Meigo の研究を進めることにより、神経回路形成における小胞体ストレス応答の生理的役割、特異性獲得の分子機構を明らかにできると考えている。

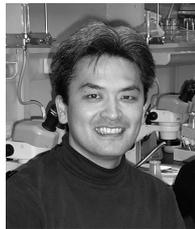
6. おわりに

今回紹介したショウジョウバエ嗅覚系二次神経・投射神経の樹状突起ターゲティングは、50 種類の糸球体の中から一つを選び投射するという非常にシンプルな系である。それにも関わらず、我々はその分子機構を説明するための十分な分子、作動原理を理解できていない。今後、さらに遺伝学的、生化学的な解析を駆使することにより、Meigo のような想定外の分子の関与、新たな分子基盤が明らかになっていくと予想される。これらの知見は、他の神経回路、さらにはほかの生物種における樹状突起ターゲティングの制御機構を理解する上での基盤情報として活用されるだろう。

- 1) Vrieseling, E. & Arber, S. (2006) *Cell*, 127, 1439–1452.
- 2) Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (2003) *Neuron*, 40, 229–242.
- 3) Jefferis, G.S. & Hummel, T. (2006) *Semin. Cell & Dev. Biol.*, 17, 50–65.
- 4) Lee, T. & Luo, L. (1999) *Neuron*, 22, 451–461.
- 5) Komiyama, T., Sweeney, L.B., Schuldiner, O., Garcia, K.C., & Luo, L. (2007) *Cell*, 128, 399–410.
- 6) Hong, W., Zhu, H., Potter, C.J., Barsh, G., Kurusu, M., Zinn, K., & Luo, L. (2009) *Nat. Neurosci.*, 12, 1542–1550.
- 7) Chihara, T., Luginbuhl, D., & Luo, L. (2007) *Nat. Neurosci.*, 10, 828–837.
- 8) Sekine, S.U., Haraguchi, S., Chao, K., Kato, T., Luo, L., Miura, M., & Chihara, T. (2013) *Nat. Neurosci.*, 16, 683–691.
- 9) Kainuma, M., Chiba, Y., Takeuchi, M., & Jigami, Y. (2001) *Yeast*, 18, 533–541.
- 10) Ishida, N., Miura, N., Yoshioka, S., & Kawakita, M. (1996) *J. Biochem.*, 120, 1074–1078.
- 11) Nakanishi, H., Nakayama, K., Yokota, A., Tachikawa, H., Takahashi, N., & Jigami, Y. (2001) *Yeast*, 18, 543–554.
- 12) Dejima, K., Murata, D., Mizuguchi, S., Nomura, K.H., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Kamiyama, S., Nishihara, S., & Nomura, K. (2009) *FASEB J.*, 23, 2215–2225.
- 13) Pasquale, E.B. (2008) *Cell*, 133, 38–52.
- 14) Dalton, R.P., Lyons, D.B., & Lomvardas, S. (2013) *Cell*, 155, 321–332.
- 15) Coelho, D.S., Cairrao, F., Zeng, X., Pires, E., Coelho, A.V., Ron, D., Ryoo, H.D., & Domingos, P.M. (2013) *Cell Reports*, 5, 791–801.

著者寸描

●千原 崇裕 (ちはら たかひろ)



東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室准教授。理学博士。

■略歴 1973年熊本に生る。熊本大学薬学部卒業，総合研究大学院大学（国立遺伝学研究所）にて学位取得。2002年からスタンフォード大学で博士研究員（JST長期在外若手研究員，学振海外特別研究員）。

06年東京大学大学院薬学研究科助手に着任。同所属助教，講師を経て，13年より現職。

■研究テーマと抱負 個体レベルでの細胞生物学。神経細胞をモデルに，個々の細胞がどのようにして「自分のかたち」を理解し，調節しているのか，それがどのように細胞・組織機能に反映されているのかを理解したい。

■趣味 息子の野球指導と試合観戦。研究妄想（妄想研究ではない）。学生との議論。読書。